

**Über die Heinzkörperbildung
in Neugeborenenerythrozyten**

Monika Keller

1971



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Kinderklinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. K. Betke

Über die Heinzkörperbildung
in Neugeborenenerythrozyten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer hohen medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Monika Keller

aus

Laggenbeck

München 1971



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. E. Kleihauer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. K. Betke

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 6.7.1971

DISSERTATIONS – und FOTODRUCK FRANK oHG
8000 München 2 · Gabelsbergerstr. 15 · Tel.: 2 80 90 90

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Fragestellung	3
3. Verzeichnis der Abkürzungen	4
4. Material und Methoden	5
4.1. Gewinnung des Blutes	5
4.1.1. Neugeborenenblut	5
4.1.2. Erwachsenenblut	5
4.2. Inkubationsexperimente zur Heinzkörperbildung	5
4.2.1. Inkubation von Neugeborenen- Erwachsenenblut mit Acetylphenylhydrazin	5
4.2.2. Inkubation von Nabelschnur- und Erwachsenenblut mit Phenylhydrazin	5
4.2.3. Inkubation von gewaschenen Erythrozyten mit Acetylphenylhydrazin	5
4.2.4. Inkubation von Nabelschnur- und Erwachsenenerythrozyten mit Acetyl- phenylhydrazin in Gegenwart von Erythrozytenlysat	5
4.3. Messung der Heinzkörperbildung	6
4.4. Enzymatische Bestimmung von Acetat	6
5. Ergebnisse	7
5.1. Heinzkörperbildung in Vollblut durch Acetylphenylhydrazin	7
5.2. Abhängigkeit der Heinzkörperbildung von der Acetylphenylhydrazin-Konzentration	9
5.3. Heinzkörperbildung in Erythrozyten von Citratblut und Blut mit ACD-Stabilisator	9
5.4. Heinzkörperbildung in gewaschenen Erythrozyten	11
5.5. Abhängigkeit der Heinzkörperbildung vom Hämatokritwert	12
5.6. Heinzkörperbildung in Neugeborenenblut vor und nach Austauschtransfusion	13

	Seite
5.7. Einfluß von Nabelschnurerythrozytenlysät auf die Heinzkörperbildung in Erwachsenen- erythrozyten	14
5.8. Heinzkörperbildung mit Phenylhydrazin	14
5.9. Spaltung des Acetylphenylhydrazin in Phenylhydrazin und Acetat	18
6. Diskussion	21
7. Zusammenfassung	25
8. Literaturverzeichnis	27

1. Einleitung

Die hämolytische Heinzkörperanämie ist ein seit langer Zeit bekanntes Krankheitsbild. Sie ist morphologisch charakterisiert durch das Auftreten von Körnchen in den Erythrozyten, der sog. Heinzkörper, die durch Vitalfärbung darstellbar sind. Zwar wird dieses Krankheitsbild auch bei Erwachsenen beobachtet, doch ist es wesentlich häufiger bei Neugeborenen anzutreffen (4, 15, 33). Häufig kann man für diese Erkrankung bei Neugeborenen keine äußere Ursache erkennen, so daß man von "spontaner Heinzkörperbildung" spricht (11, 14, 15, 34). In der überwiegenden Zahl der Fälle ist jedoch das Auftreten der Krankheit mit der Aufnahme von bestimmten toxischen Substanzen in den Neugeborenenorganismus in Zusammenhang zu bringen (5). Dies kann auf verschiedene Art und Weise erfolgen. Zum einen kann es unbeabsichtigt in den kindlichen Organismus gelangen, wie z. B. Naphthalin (13, 18, 31) oder Anilinderivate etwa aus Wäschefarbe (5). Als wesentliche zweite Möglichkeit hat die Krankheit eine iatrogene Ursache. Zahlreiche Medikamente, wie p-Aminophenol-Derivate, Vitamin K-Analoga, Vitamin C, Sulfanilamide u. a. sind als potente Heinzkörperbildner beschrieben (5, 28, 33).

Zur Erklärung des Phänomens der Heinzkörperbildung sind zahlreiche Vorstellungen entwickelt worden. Doch nur für den letzten Schritt dieser, mit Sicherheit recht komplexen Reaktion, konnte eine befriedigende Erklärung geliefert werden. Die charakteristischen Granula in den Erythrozyten entstehen durch Oxydation von Hämoglobin und bestehen aus denaturiertem Globin und Oxidationsprodukten des Hämanteils (1, 19, 21, 25, 32). Die Gründe für die bevorzugte pathologische Oxydation des Hämoglobins im Neugeborenenerythrozyten sind unklar. Experimentelle Untersuchungen haben darauf hingewiesen, daß in den Erythrozyten lokalisierte Enzyme, wie Katalase und Glutathion-Peroxydase, vermindert aktiv sein können (9, 10, 12, 16, 17, 20, 26, 27, 29, 35). Diese Enzyme haben wahrscheinlich die Funktion des Hämoglobin vor Oxydation zu schützen. Eine andere Erklärung wurde in dem unterschiedlichen Reaktionsvermögen von adultem und fetalem Hämoglobin gesucht, ohne daß jedoch entsprechende Befunde erhoben werden konnten (30). Nach dem gegenwärtigen Stand der Kenntnisse kann nicht entschieden werden, ob der Bildung von Heinzkörpern durch die verschiedenen Substanzklassen ein

gemeinsamer Mechanismus zugrunde liegt, oder ob den verschiedenen Substanzgruppen verschiedene Reaktionsabläufe entsprechen, die dazu führen, daß das Hämoglobin in den Erythrozyten oxydiert werden kann.

Eine Möglichkeit, Einblick in das Geschehen der Heinzkörperbildung zu erhalten, bieten in vitro Experimente (2, 6, 7, 8, 22, 23, 24, 30), in denen Erythrozyten Heinzkörperbildenden Substanzen ausgesetzt werden. In diesem Sinne wird in der vorliegenden Arbeit die Bildung von Heinzkörpern durch Acetylphenylhydrazin als Modellreaktion untersucht.

2. Fragestellung

Wie in der Einleitung erwähnt, soll in dieser Untersuchung die Bildung von Heinzkörpern durch Acetylphenylhydrazin (APH) in vitro als Modellreaktion dienen, um die verstärkte Heinzkörperbildung in Neugeborenen näher zu charakterisieren. Als Quelle für Neugeborenenblut soll Nabelschnurblut dienen, da es aus dem placentaren Anteil der Nabelschnur sehr einfach zu erhalten ist. Sämtliche Untersuchungen sollen als Parallelexperimente durchgeführt werden, in denen Neugeborenenblut mit Erwachsenenblut verglichen werden soll. Zu einer ersten Charakterisierung der Reaktion soll die Kinetik der Heinzkörperbildung in Erythrozyten von Citratblut verfolgt werden. Weiterhin soll gezeigt werden, ob die Neigung zur Heinzkörperbildung eine genuine Eigenschaft der Erythrozyten darstellt oder vom umgebenden Blutplasma beeinflusst wird. Sodann soll die Abhängigkeit der Heinzkörperbildung von äußeren Parametern, wie Erythrozytenkonzentration und APH-Konzentration geprüft werden. Als ein Fall physiologischer Änderungen von Umgebungsparametern soll das Verhalten von Erwachsenenerythrozyten in Neugeborenenblut untersucht werden. Als Experimentiermodell bietet sich dazu Blut von Neugeborenen mit Morbus haemolyticus neonatorum nach Austauschtransfusion an. Als in vitro Experiment soll dazu die Überführung von Neugeborenen- bzw. Erwachsenenerythrozyten in eine Umgebung dienen, die Nabelschnurerythrozyten in lysierter Form enthält.

Einen ersten Schritt zum Verständnis des molekularen Mechanismus der APH-Wirkung soll dann die Untersuchung der Frage darstellen, ob APH selbst oder sein etwaiges Stoffwechselprodukt Phenylhydrazin die Bildung von Heinzkörpern auslöst. Dazu soll einerseits der Effekt von Phenylhydrazin auf Nabelschnur- und Erwachsenenerythrozyten im Vergleich zu APH untersucht werden, andererseits soll geklärt werden, ob in den Erythrozyten aus APH Phenylhydrazin entstehen kann.

3. Verzeichnis der Abkürzungen

A-Blut	- Erwachsenenblut
APH	- β -Acetylphenylhydrazin
HK	- Heinzkörper
NS-Blut	- Nabelschnurblut

4. Material und Methoden

4.1. Gewinnung des Blutes

4.1.1. Neugeborenenblut: Die Blutproben wurden unmittelbar nach der Geburt aus dem placentaren Teil der Nabelschnur entnommen und mit 1/10 Volumen Natriumcitrat (3.8 %) versetzt.

4.1.2. Erwachsenenblut: Die Blutproben wurden aus der Kubitalvene entnommen und ebenso wie das Nabelschnurblut mit Natriumcitrat versetzt. Statt Citrat wurde vergleichsweise auch ACD-Stabilisator verwandt.

4.2. Inkubationsexperimente zur Heinzkörperbildung

4.2.1. Inkubation von NS- und A-Blut mit APH. 2 ml Proben von Citratblut wurden in Reagenzgläsern mit 0.4 ml einer 66 mM APH-Lösung in 0.132 M Phosphatpuffer, pH 7.4, und 0.9 % NaCl versetzt und in einem Wasserbad bei 37° C inkubiert.

4.2.2. Inkubation von NS- und A-Blut mit Phenylhydrazin. Nabelschnur und Erwachsenenblut wurde unter den gleichen Bedingungen wie unter 4.2.1 inkubiert mit der Ausnahme, daß statt APH-Lösung 0.01 ml einer 70 mM Phenylhydraziniumchloridlösung in 0.132 M Phosphatpuffer, pH 7.4, und 0.9 % NaCl zugesetzt wurde.

4.2.3. Inkubation von gewaschenen Erythrozyten mit APH. Erythrozyten wurden durch Zentrifugation bei 3000 U/min für 10 min vom Plasma abgetrennt, die Erythrozyten mit einem ca. 10-fachen Volumen an 0.9 % NaCl resuspendiert und in der gleichen Weise zentrifugiert. Der Waschvorgang wurde viermal wiederholt. Dann wurden die Erythrozyten in soviel 0.9 % NaCl resuspendiert, daß der gleiche Hämatokrit wie im Ausgangsvollblut erreicht wurde. Diese Erythrozytensuspension wurde dann wie unter 4.2.1. angegeben mit APH versetzt und inkubiert.

4.2.4. Inkubation von NS- und A-Erythrozyten mit APH in Gegenwart von Erythrozytenlysat. Erwachsenen- und Nabelschnurcitratblut wurde 20 min bei

6000 U/min zentrifugiert, das Plasma verworfen und zu den Erythrozyten ein doppeltes Volumen aqua dest. gegeben. Die Erythrozytenghosts wurden durch Zentrifugation, 20 min bei 6000 U/min, abgetrennt. Dem Überstand wurde soviel festes NaCl zugesetzt, daß die Endkonzentration einer 0.9 %-igen NaCl-Lösung entsprach. Erythrozyten aus Citratblut wurden in dieser Lösung in solcher Konzentration resuspendiert, daß der Hämatokrit dem Wert im Ausgangscitratblut entsprach, und wie unter 4.2.1. angegeben mit APH inkubiert.

4.3. Messung der Heinzkörperbildung.

Zu den in den einzelnen Experimenten angegebenen Zeiten wurde dem Inkubationsansatz jeweils 1 Tropfen entnommen und mit 1 Tropfen 0.5 % Nilblausulfat in 0.9 % NaCl vermischt und 10 min in einer feuchten Kammer bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wurde ein Ausstrich hergestellt und dieser luftgetrocknet. Unter Ölimmersion wurden in den Ausstrichen jeweils 1000 Zellen gezählt. Die Anzahl der Heinzkörperhaltigen Zellen wurde in Prozent der gesamten gezählten Zellen angegeben.

4.4. Enzymatische Bestimmung von Acetat.

Suspensionen gewaschener Nabelschnur- und Erwachsenenerythrozyten (siehe 4.2.3.) in 0.9 % NaCl wurden auf gleichen Hämatokrit eingestellt. Gleiche Volumina beider Suspensionen wurden zentrifugiert und die Erythrozytensedimente mit 2-fachen Volumina 10 mM Triäthanolaminpuffer, pH 7.4, versetzt. Die entstandenen Lysate wurden 24 Stunden gegen den gleichen Puffer dialysiert. Das Dialysat wurde mit APH bei 25°C (bzw. 37°C) inkubiert. Die APH-Konzentration im Ansatz war 10.9 mM. Nach den in den einzelnen Experimenten angegebenen Zeiten wurde die Reaktion durch Erhitzen von Aliquots für 5 min auf 95°C gestoppt. Das ausgefallene Protein wurde abzentrifugiert und ein Aliquot des Überstandes zur enzymatischen Bestimmung von Acetat eingesetzt. Diese erfolgte nach BERGMAYER und MOELLERING (3).

5. Ergebnisse

5.1. Heinzkörperbildung in Vollblut durch Acetylphenylhydrazin (APH).

Blutproben von Neugeborenen und Erwachsenen, die durch Zusatz von Citrat ungerinnbar gemacht worden waren, wurden unter physiologischen Bedingungen, d.h. bei 37°C und pH 7,4, mit APH inkubiert. In Abständen von 1/2 bis 1 Stunde wurden den Proben Anteile entnommen, und in diesen der Prozentsatz an Heinzkörperhaltigen Erythrozyten bestimmt. Dabei beobachtet man folgendes Verhalten (Abb. 1).

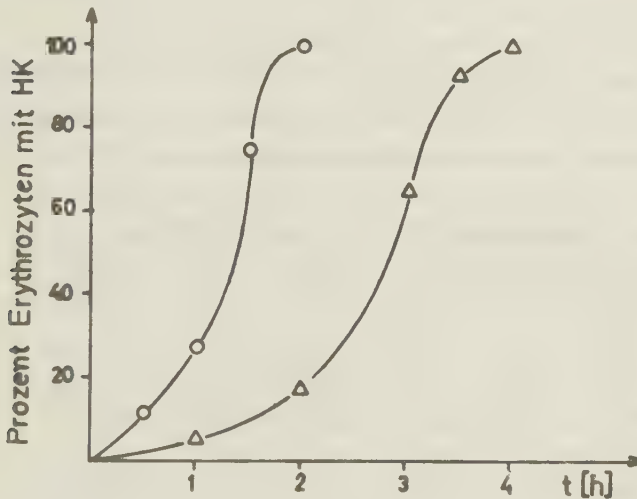


Abb. 1 Zeitlicher Ablauf der Heinzkörperbildung durch APH in Nabelschnur- und Erwachsenenerythrozyten in Vollblut. Inkubation unter Standardbedingungen (siehe 4.2.1).

APH-Konzentration 10,9 mM.

NS: ○-○ A: △-△

In beiden Fällen sieht man, daß nach bestimmten Zeiten in sämtlichen Erythrozyten Heinzkörper gebildet wurden. Weiterhin gilt für beide Fälle, daß der zeitliche Ablauf der Reaktion nicht linear ist. Vielmehr beobachtet man etwa während des ersten Drittels der gesamten Zeit, die bis zum Erreichen des 100 %-HK-Wertes vergeht, eine relativ langsame Zunahme des Anteils an Heinzkörperhaltigen

Erythrozyten ("Latenzzeit"). Auf diese Phase folgt im zweiten Drittel des Reaktionsablaufes ein steiler Anstieg der Heinzkörperbildung ("Heinzkörperbildungszeit"), der im letzten Teil, bis zum Erreichen des 100 %-Wertes, wieder abflacht. Als auffallender Unterschied zwischen NS- und A-Blut ergibt sich, daß bei erstem die Erythrozyten bereits nach 2 Stunden, bei letzterem erst nach 4 Stunden 100 % Heinzkörper enthalten. Darüber hinaus ist zu bemerken, daß für die verkürzte Reaktionszeit der NS-Erythrozyten gegenüber den A-Erythrozyten im wesentlichen eine Verkürzung der Latenzzeit verantwortlich ist, während die Heinzkörperbildungszeit nur geringfügig verlängert ist. Dieser Befund wurde in zahlreichen Experimenten bestätigt. In Tabelle 1. sind 5 repräsentative Parallelexperimente dargestellt. Nimmt man den 5 %-Wert als Maß für die Latenzzeit, so ergibt sich eine durchschnittlich mehr als vierfach kürzere der NS-Erythrozyten gegenüber der der A-Erythrozyten. Mit der Zeitdifferenz zwischen 30 % und 70 % Heinzkörper als Maß für die "Heinzkörperbildungsreaktion" ergibt sich ein Faktor 2 von A-Blut gegen NS-Blut. Aus Tab. 1 geht weiterhin hervor, daß der Streubereich entsprechender Werte bei NS-Blut wesentlich geringer ist als

	Exp.	5 %	30 %	50 %	70 %	100 %
A	1 (MK)	60	140	160	190	240
	2 (MK)	60	160	190	210	240
	3 (BF)	60	210	250	280	330
	4 (EK)	120	180	190	210	270
	5 (WN)	75	145	150	160	180
NS	1	15	70	80	90	120
	2	15	50	65	75	120
	3	15	65	70	75	90
	4	30	70	80	90	120
	5	15	70	85	95	120

Tab. 1. Zeitlicher Ablauf der Heinzkörperbildung durch APH in Nabelschnur- und Erwachsenenerythrozyten in Vollblut bei fünf verschiedenen Parallelversuchen. APH-Konzentration in allen Fällen 10,9 mM. Die Nabelschnurblutproben stammten von fünf verschiedenen Neugeborenen. Die Erwachsenenblutproben 1 und 2 stammten von der gleichen, die übrigen von verschiedenen Testpersonen. Die Zahlen in der Tabelle geben diejenigen Zeiten in Minuten an, nach denen die entsprechenden Prozent Heinzkörperwerte erreicht wurden. Die Werte sind aus den zugehörigen Kurven extrapoliert.

bei A-Blut. Offensichtlich scheint ein beträchtlicher Unterschied sowohl in der Latenzzeit als auch in der Heinzkörperbildungszeit zwischen den einzelnen Erwachsenen-Testpersonen zu bestehen. Gleiche Erwachsenen-Versuchspersonen zeigten eine geringere Streubreite als ein Kollektiv von verschiedenen Versuchspersonen.

Um nun nachzuweisen, daß die in Abb. 1 und Tab. 1 gezeigten Unterschiede zwischen NS- und A-Blut nicht Zufallsprodukt unterschiedlichen Verhaltens der beiden Erythrozyten-Typen gegen sie umgebende Parameter darstellen, wurden in den folgenden Experimenten die Inkubationsbedingungen variiert.

5.2. Abhängigkeit der Heinzkörperbildung von der APH-Konzentration.

Als wesentlicher äußerer Parameter der Heinzkörperbildung erwies sich die Konzentration des APH im Inkubationsansatz. Abb. 2 A zeigt dies für drei verschiedene APH-Konzentrationen bei Erwachsenenerythrozyten. Als Referenz diente die in vorausgegangenen Experimenten eingesetzte Konzentration von 10.9 mM APH. Bei der niedrigeren Konzentration von 5.5 mM APH erfolgt eine drastische Verschiebung dieser Kurve nach längeren Zeiten, bei Erhöhung auf 20.0 mM APH eine deutliche nach kürzeren. Ganz offensichtlich ist vor allem die Latenzzeit von der APH-Konzentration abhängig. Sie ist bei den angegebenen Konzentrationen auf das Doppelte erhöht, bzw. auf ein Viertel erniedrigt. Demgegenüber ist die Heinzkörperbildungszeit, nach der in 5.1. gegebenen Definition, insbesondere bei Erhöhung der APH-Konzentration weit geringer betroffen. Eine relativ hohe APH-Konzentration bewirkt also bei Erwachsenenerythrozyten das gleiche wie eine relativ niedrige bei Neugeborenenerythrozyten. Daraus ist zu schließen, daß der Unterschied zwischen beiden Erythrozyten Typen quantitativer und nicht qualitativer Natur ist. Sinngemäß zeigen auch Neugeborenenerythrozyten einen beschleunigten Reaktionsablauf bei Erhöhung der APH-Konzentration (Abb. 2 B).

5.3. Heinzkörperbildung in Erythrozyten von Citratblut und Blut mit ACD-Stabilisator.

Man kann sich vorstellen, daß das die Erythrozyten umgebende Substratmilieu einen unspezifischen Einfluß auf die Heinzkörperbildung ausüben könnte. Ein

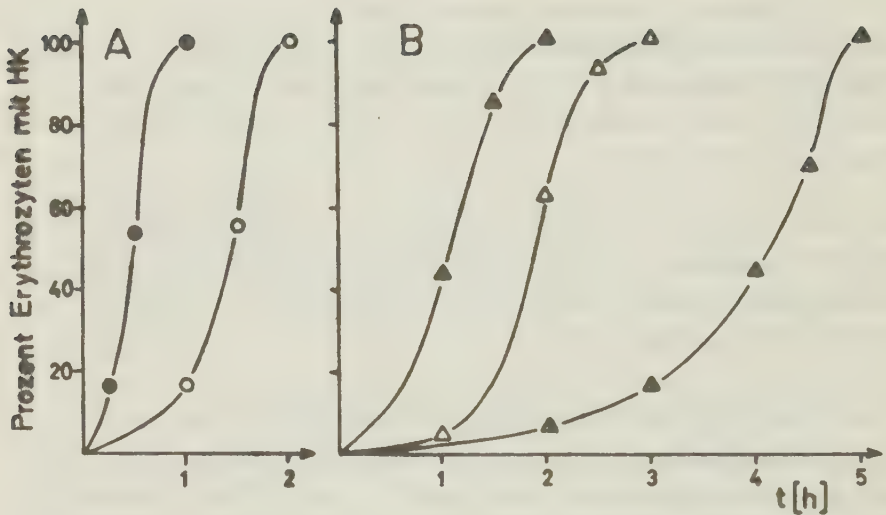


Abb. 2 Abhängigkeit des zeitlichen Ablaufs der Heinzkörperbildung von der APh-Konzentration. Sämtliche Blutproben stammten von der gleichen Versuchsperson.

A: Neugeborenenblut: 10.9 mM APh ○-○
 20.0 mM APh ●-●
 B. Erwachsenenblut: 5.5 mM APh △-△
 10.9 mM APh △-△
 20.0 mM APh ▲-▲

solcher Einfluß könnte etwa von den Citrat-Ionen ausgehen, die dem Blut zur Gerinnungshemmung zugesetzt wurden. Deshalb wurde solches Blut mit anderem verglichen, dem zu diesem Zweck ACD-Stabilisator zugegeben wurde. In diesem Fall enthielt das Inkubationsmedium 136 mM Glucose neben 2.5 % Citrat. Abb. 3 zeigt das Ergebnis dieses Experimentes, das mit Erwachsenenblut durchgeführt wurde. Die beiden dargestellten Kinetiken zeigen nur geringe Abweichungen, insbesondere ist die Latenzzeit vollkommen unverändert. Die Heinzkörperbildungszeit ist in dem ACD stabilisierten Blut praktisch nicht verändert.

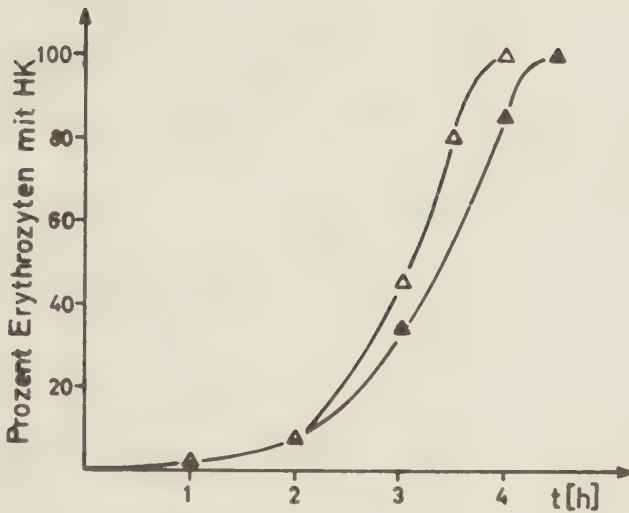


Abb. 3 Vergleich des zeitlichen Ablaufs der Heinzkörperbildung in Erwachsenen-erythrozyten aus Citrat- und ACD stabilisiertem Blut. Die Inkubation erfolgte unter Standardbedingungen (siehe 4.2.1.).

Citrat: ▲-▲ ACD-Stabilisator: △-△

5.4. Heinzkörperbildung in gewaschenen Erythrozyten.

Da die in vivo Zusammensetzung des Blutplasmas, das die Neugeborenen- und Erwachsenenerythrozyten umgibt, mit Sicherheit verschieden ist, bestand eine weitere Kontrolle zum Ausschluß extraerythroytärer Faktoren darin, die Heinzkörperbildung in isolierten und gewaschenen Erythrozyten zu untersuchen. Zur Inkubation mit APH wurden die Erythrozyten dann in physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert. Dabei ergab sich weder für den typischen Ablauf der Heinzkörperbildung noch für die Differenz zwischen Erwachsenen- und Neugeborenenerythrozyten ein sichtbarer Unterschied zu den Vollblutexperimenten. Daraus ist zu schließen, daß sowohl Geschwindigkeit als auch Verlauf der Heinzkörperbildung durch Faktoren determiniert sind, die im Erythrozyten selbst, unter Einschluß der Membran, lokalisiert sind.

5.5. Abhängigkeit der Heinzkörperbildung vom Hämatokritwert.

Der nächste Schritt der Überlegungen ging dahin, ob die einzelnen Erythrozyten sich bei der Heinzkörperbildung gegenseitig beeinflussen, mit anderen Worten, ob eine Konzentrationsänderung der Erythrozyten, d. h. eine Änderung des Hämatokritwertes, sich auf die Reaktion auswirkt. Die diesbezüglichen Experimente sind in Abb. 4 A und B dargestellt.

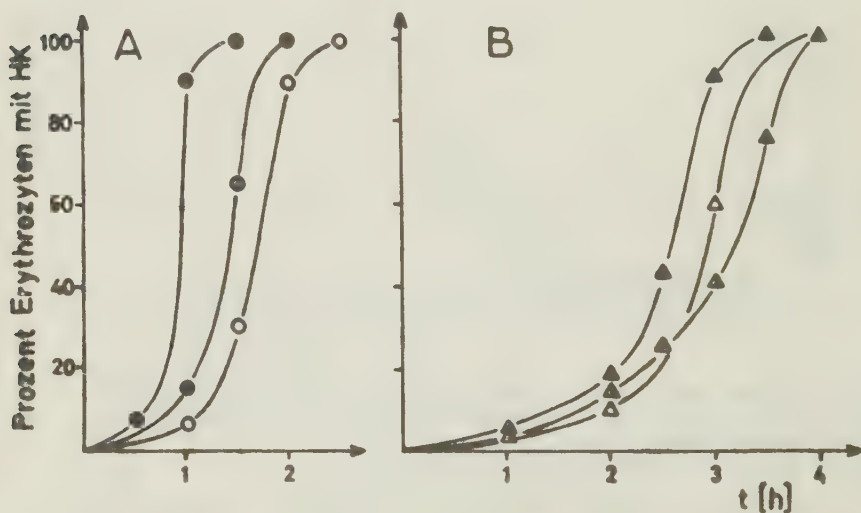


Abb. 4 A

Abb. 4 B

Abb. 4. Hämatokrit und Heinzkörperbildung durch APH in Nabelschnur- und Erwachsenenblut. Die Inkubation erfolgte unter Standardbedingungen (siehe 4.2.1)

A: NS-Blut. Hämatokritwert: ●-● 15 %

○-○ 30 %

●-● 50 %

B: A-Blut. Hämatokritwert: ▲-▲ 19 %

▲-▲ 31 %

▲-▲ 41 %

Sowohl Neugeborenen- als auch Erwachsenenblut wurde jeweils auf verschiedene Hämatokritwerte eingestellt (siehe Legende zu Abb. 4). In beiden Fällen konnte kein sichtbarer Unterschied im Verlauf der Heinzkörperbildungskurve bei den drei verschiedenen Hämatokritwerten festgestellt werden. Dieser Befund stützt die Annahme, daß die Heinzkörperbildung ein rein intraerythrozytärer Prozeß ist.

5.6. Heinzkörperbildung in Neugeborenenblut vor und nach Austauschtransfusion.

Ein in vivo Modell, in dem Erwachsenenerythrozyten in Neugeborenenerythrozyten-Umgebung überführt werden, stellt die Austauschtransfusion dar, wie sie bei Morbus haemolyticus neonatorum durchgeführt wird. Abb. 5 zeigt das Ergebnis eines Versuches, in dem die Heinzkörperbildungsreaktion im Blut von Neugeborenen vor (A) und zu verschiedenen Zeiten nach Austauschtransfusion (B + C) gemessen wurde. Durch die Austauschtransfusion wurden ca. 90 % der kindlichen Erythrozyten durch Erwachsenenerythrozyten ersetzt. Als Kontrolle wurde das Spenderblut (D) getestet, das das gewohnte Bild bietet, ebenso wie das vor der Austauschtransfusion entnommene Neugeborenenblut (A). Bereits das 5 Minuten nach Abschluß des Blutaustausches entnommene Blut zeigt eine Verschiebung nach kürzeren Zeiten (C). Die nach 12 Stunden entnommene Probe (B) zeigt eine praktisch

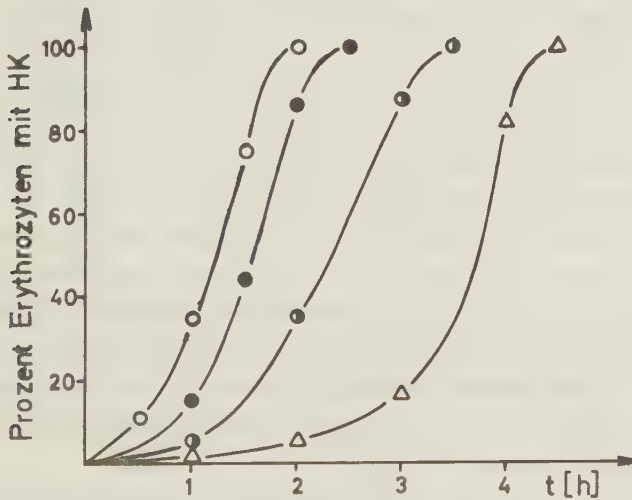


Abb. 5 Verhalten der Heinzkörperbildung in Erythrozyten eines Neugeborenen mit Morbus haemolyticus neonatorum (MHN) vor und nach Austauschtransfusion. Die Heinzkörperbildung wurde zu zwei Zeiten nach der Austauschtransfusion bestimmt. Als Kontrollen wurden das Spenderblut und Neugeborenenblut vor dem Austausch untersucht.

- | | | |
|----------|-----|------------------------------------|
| Kurve A: | ○—○ | Neugeborenenblut vor dem Austausch |
| Kurve B: | ●—● | 12 Stunden nach dem Austausch |
| Kurve C: | ○—○ | 5 Minuten nach dem Austausch |
| Kurve D: | △—△ | Spenderblut (Kontrolle) |

vollständige Angleichung an das ursprüngliche Neugeborenenblut. Die auffälligste Veränderung, die an den Erwachsenenerythrozyten im kindlichen Organismus erfolgt, ist offensichtlich die Verkürzung der Latenzzeit in der Heinzkörperbildung.

Ein anderes, nämlich ein in vitro Modell zur Untersuchung äußerer Einflüsse auf die Heinzkörperbildung in den Erythrozyten, stellt folgende Versuchsanordnung dar.

5.7. Einfluß von Nabelschnurerythrozytenlysat auf die Heinzkörperbildung in Erwachsenenerythrozyten.

Dieses Experiment wurde so durchgeführt, daß Erwachsenenerythrozyten mit Nabelschnurerythrozytenlysat versetzt wurden (Abb. 6 A), und zur Kontrolle Erwachsenenerythrozyten mit Erwachsenenerythrozytenlysat (Abb. 6 B). In beiden Fällen wurden Nabelschnurerythrozyten, von denen das Lysat stammte, zur Kontrolle mitgetestet. Aus Abb. 6 A ist eine deutliche Beschleunigung der Heinzkörperbildung in den Erwachsenenerythrozyten nach Zusatz von Neugeborenenerythrozytenlysat ersichtlich. Diese geht soweit, daß sich die Erwachsenenerythrozyten nicht mehr von den Neugeborenenerythrozyten unterscheiden. Am deutlichsten drückt sich dies wieder in der Verkürzung der Latenzzeit aus. Zwar erhöht auch der Zusatz von Erwachsenenerythrozytenlysat zu Erwachsenenerythrozyten die Reaktionsgeschwindigkeit (Abb. 6 B), doch ist der Effekt hierbei weit weniger ausgeprägt. Bemerkenswert ist dabei die Konstanz der Latenzzeit. Diese Beobachtungen, zusammen mit Überlegungen über die chemische Reaktionsfähigkeit von APH, legen die Vermutung nahe, daß eine Veränderung am APH-Molekül stattfindet, wenn es in das Innere der Erythrozyten gelangt. Aufgrund der Ergebnisse aus diesem Versuch wurde nun das mögliche Folgeprodukt Phenylhydrazin auf seine Heinzkörperbildungsfähigkeit getestet.

5.8. Heinzkörperbildung mit Phenylhydrazin.

In Analogie zu den in 5.1. dargestellten Experimenten mit APH wurden Neugeborenen- und Erwachsenenerythrozyten mit Phenylhydrazin inkubiert. Dabei stellte sich heraus, daß Phenylhydrazin, in gleichen Konzentrationen wie APH angewandt, zu einer vollständigen Heinzkörperbildung innerhalb von wenigen Minuten führt. Deshalb wurde die Konzentration von Phenylhydrazin im Inkubationsansatz auf 1/30 verringert. Selbst bei dieser Konzentration zeigten die Erwachsenen-

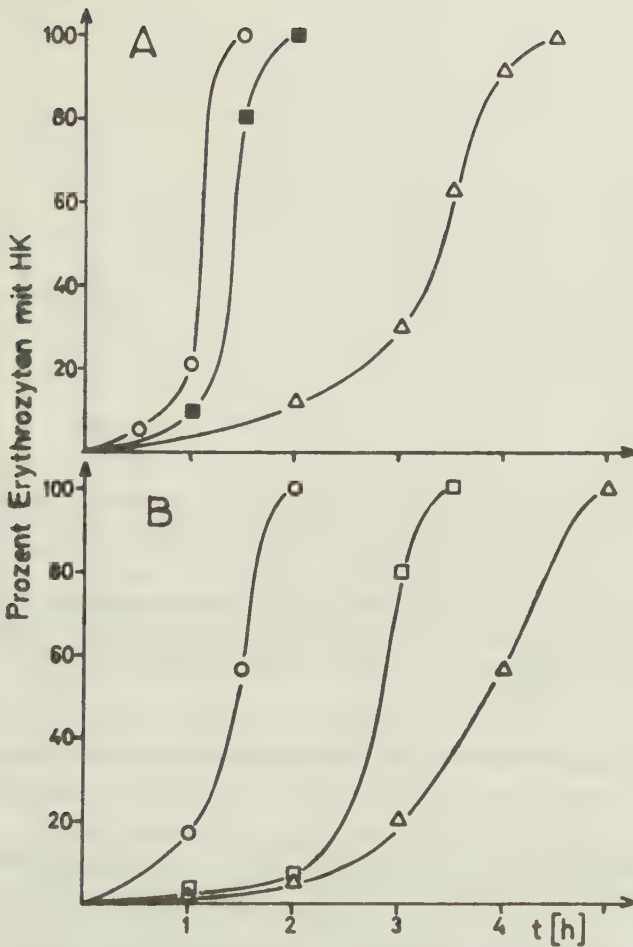


Abb. 6 Effekt von Nabelschnurerthrozytenlysat und Erwachsenenerythrozytenlysat auf den Ablauf der Heinzkörperbildung in Erwachsenenerythrozyten.

A: Erythrozyten aus A-Blut wurden in einem Lysat von Nabelschnurerthrozyten in Wasser, das anschließend mit NaCl isoton gemacht worden war, resuspendiert und mit APH inkubiert (siehe 4.2.1.). Die Konzentration an Nabelschnurerthrozytenlysat im Inkubationsansatz, die in lysierter Form zugegeben wurden, entsprach einem Hämatokritwert von 33 %.

B: Erythrozyten aus A-Blut wurden in einem Lysat von A-Erythrozyten in Wasser, das anschließend mit NaCl isoton gemacht worden war, resuspendiert und mit APH inkubiert (siehe 4.2.1.). Die Konzentration von lysierten A-Erythrozyten in Abb. 6 B war die gleiche wie die der lysierten NS-Erythrozyten in Abb. 6 A.

Δ-Δ A-Blut ○-○ NS-Blut □-□ bzw. ■-■ Mischblut

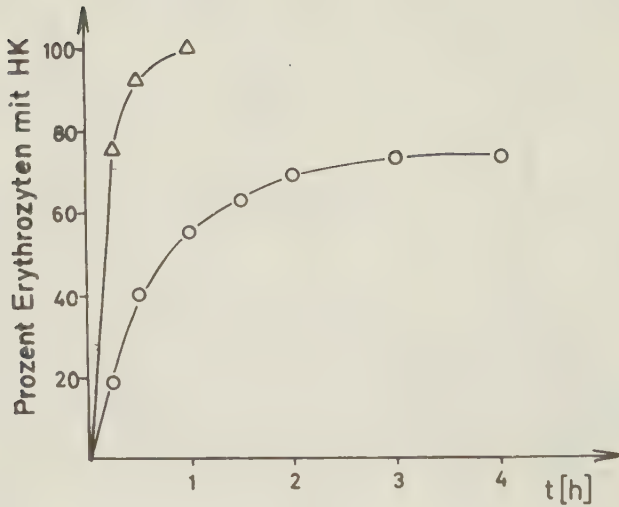


Abb. 7. Zeitlicher Ablauf der Heinzkörperbildung durch Phenylhydrazin in Nabelschnur- und Erwachsenenerythrozyten in Citratblut. Die Konzentration von Phenylhydrazin im Inkubationsansatz war 0,34 mM. Sonstige Bedingungen wie in Abb. 1. NS: ○ - ○ A: △ - △

erythrozyten innerhalb von 1 bis 2 Stunden 100 %-ige Heinzkörperbildung. Neugeborenenerythrozyten reagierten zwar am Anfang ebenfalls mit sehr hoher Geschwindigkeit (Abb. 7), doch fiel diese schnell wieder ab, und die Heinzkörperbildung erreichte nach 4 Stunden einen nicht höheren Wert als 70 %. Mit Phenylhydrazin zeigen die beiden Erythrozyten-Typen also gerade ein umgekehrtes Verhalten was die Geschwindigkeit betrifft, verglichen mit APH. Ein weiterer eklatanter Unterschied zu den APH-Kinetiken stellt das Fehlen der Latenzzeit dar. Die Ergebnisse aus fünf Parallelexperimenten sind in Tab. 2 dargestellt.

	Exp.	30 %	50 %	70 %	100 %
NS	1	30	210	-	-
	2	30	120	360	-
	3	30	60	180	-
	4	30	60	90	-
	5	30	60	270	-
A	1 (MK)	15	30	90	150
	2 (MK)	15	30	60	180
	3 (BF)	-	15	30	120
	4 (EK)	-	-	15	60
	5 (WN)	15	30	60	150

Tab. 2. Zeitlicher Ablauf der Heinzkörperbildung durch Phenylhydrazin in Neugeborenen- und Erwachsenenerythrozyten in Vollblut bei fünf verschiedenen Parallelversuchen. Die Phenylhydrazin-Konzentration betrug in allen Fällen 0,34 mM. Die Zahlen in der Tabelle geben diejenigen Zeiten in Minuten an, nach denen die entsprechenden Prozent Heinzkörperwerte erreicht wurden.

Die Initialgeschwindigkeit, gemessen am 30 %-Wert, ist bei den Erwachsenenerythrozyten doppelt so hoch wie bei den Neugeborenenerythrozyten. In keiner der fünf Neugeborenen-Blutproben wurde der 100 %-Wert erreicht. Der Grund dafür ist nicht bekannt.

Diese Beobachtungen weisen Phenylhydrazin als potenten Heinzkörperbildner aus. Die Kinetiken unterstellen, daß ein anderer Mechanismus, zumindest was die primären Schritte betrifft, als beim APH existieren muß. Diese Überlegung führte zu der Hypothese, daß APH in der Art und Weise reagiert, daß es mit einer bestimmten Verzögerung, in Abhängigkeit von der Art der Erythrozyten, Phenylhydrazin bildet. Demzufolge wurde versucht, zu verifizieren, ob diese Umwandlungsreaktion in den Erythrozyten tatsächlich stattfindet.

5.9. Spaltung des APH in Phenylhydrazin und Acetat.

Die Verfolgung der Hydrolyse von APH ist möglich durch die Messung des dabei entstehenden Acetats. APH wurde mit Erythrozytenlysaten inkubiert und nach Stoppen der Reaktion durch Hitzedenaturierung das entstandene Acetat enzymatisch bestimmt. Vor der Durchführung dieser Reaktion war es nötig, einige Kontrollen durchzuführen. Da Erythrozyten bekanntlich Acetat enthalten, mußte dieses endogene Acetat erst durch Dialyse entfernt werden. In Tab. 3 ist gezeigt, daß dieses erfolgreich durchgeführt wurde, da nur noch sehr geringe Acetatsmengen, die an der Grenze der Bestimmungsmethode liegen, gefunden wurden. Weiter zeigt Tab. 3, daß unter Standardinkubationsbedingungen ohne Zusatz von APH kein Acetat in den Erythrozyten produziert wird.

Zum anderen war zu prüfen, ob APH unter Inkubationsbedingungen spontan, d. h. ohne enzymatische Katalyse, hydrolysiert wird. Dies wurde getestet, indem APH mit thermisch denaturiertem Erwachsenen- und Neugeborenenerythrozytenlysat inkubiert wurde. Die Tab. 4 zeigt bereits für den Nullwert, und zwar für beide Erythrozytentypen, nicht unbeträchtliche Mengen an Acetat an. Ganz offensichtlich rühren diese von Verunreinigungen des APH mit Acetat her. Da sich diese Werte

Inkubationszeit (min)	0	60	180
Erwachsenenerythrozytenlysat	0,13	0,06	0,19
Neugeborenenerythrozytenlysat	0,14	0,00	0,02

Tab. 3 Acetatgehalt in $\mu\text{Mol/ml}$ in einem Dialysat von lysierten Erwachsenen- und Nabelschnurerythrozyten. Die Konzentration der Erythrozyten in den Lysaten entspricht einem Hämatokrit von 33 % (siehe 4.4.). Inkubationstemperatur: 37°C .

jedoch nach 30 minütiger Inkubationszeit nicht erhöhen, darf man schließen, daß unter den vorliegenden Bedingungen das APH nicht spontan hydrolysiert. Die als Verunreinigungen anzusehenden Acetatsmengen sind sinngemäß von allen zu messenden Acetatwerten subtrahiert worden.

Inkubationszeit (min)	0	30
Erwachsenenerythrozytenlysate	0.55	0.38
Neugeborenenerythrozytenlysate	0.58	0.43

Tab. 4 Acetatgehalt von denaturiertem Erwachsenen- und Neugeborenenerythrozytenlysate nach Inkubation mit APH, angegeben in μMol Acetat/ml Probe. Die Konzentration der Erythrozyten in den Lysaten entspricht einem Hämatokrit von 33 % (siehe 4.4.). Inkubationstemperatur: 37°C .

Wird nun APH mit nativem Erwachsenen- und Neugeborenenerythrozytenlysate inkubiert, ist eine bemerkenswerte Produktion von Acetat zu beobachten, dies zeigt Tab. 5. Dabei sind die produzierten Acetatsmengen im Neugeborenenerythrozytenlysate höher. Ob dieser Unterschied jedoch bedeutungsvoll ist, läßt sich aufgrund

Inkubationszeit (min)	160	240
Erwachsenenerythrozytenlysate	1.76	2.31
Neugeborenenerythrozytenlysate	2.31	2.74

Tab. 5. Acetatgehalt in μMol Acetat/ml Probe in Erwachsenen und Neugeborenenerythrozytenlysate nach Inkubation mit APH. Der Blindwert aus Tab. 4 wurde subtrahiert. Die Konzentration der Erythrozyten in den Lysaten entspricht einem Hämatokrit von 33 % (siehe 4.4.). Inkubationstemperatur: 37°C .

der vorliegenden Meßdaten nicht entscheiden. In den langen Inkubationszeiten, die den Heinzkörperbildungszeiten entsprechend gewählt wurden, können durch die Produktion von Phenylhydrazin zahlreiche Artefakte eintreten. In gleichem Sinne ist die Abb. 8 zu interpretieren, in der eine Kurzzeitkinetik der APH-Hydrolyse in Erwachsenen- und Neugeborenenerythrozytenlysate dargestellt ist. Man erkennt zwar auch hier eine höhere Initial-Hydrolysegeschwindigkeit durch das Neugeborenenerythrozytenlysate, doch gelten die gleichen Einschränkungen für dieses

Experiment wie für die in Tab. 5 aufgezeigten. Mit Sicherheit kann man aus diesen Experimenten jedoch schließen, daß APH innerhalb der Erythrozyten in Phenylhydrazin umgewandelt werden kann, und dies dort, entsprechend den in 5.8. gezeigten Resultaten, die Bildung von Heinzkörpern veranlassen kann. Dieses Experiment richtet die Aufmerksamkeit auf die Permeation des APH durch die Membran der Erythrozyten.

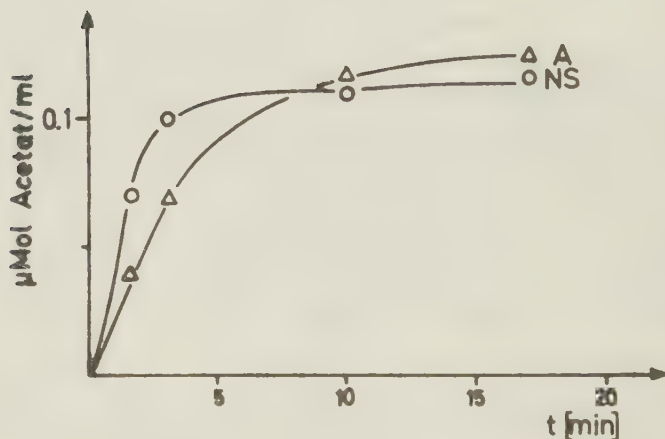


Abb. 8 Kurzzeitkinetik der APH-Hydrolyse durch Erwachsenen- und Neugeborenenerythrozytenlysat, gemessen an der Bildung von Acetat. Dimension des Acetat: $\mu\text{Mol/ml}$ Lysat. Inkubationstemperatur: 37°C . Die Konzentration der Erythrozyten in den Lysaten entspricht einem Hämatokrit von 33 % (siehe 4.4.).

6. Diskussion

Dieser Arbeit liegen zahlreiche Befunde zugrunde, die zeigen, daß eine Vielzahl von Substanzen in menschlichen Erythrozyten die Bildung von Heinzkörpern auslösen können (5). Für das in dieser Untersuchung als auslösende Substanz verwendete Acetylphenylhydrazin ist nachgewiesen worden, daß Neugeborenenerythrozyten ihm gegenüber in einem in vitro System eine höhere Empfindlichkeit entgegenbringen als Erwachsenenerythrozyten. Damit erscheint diese Reaktion geeignet, als Modell zu dienen, die klinisch beobachtet erhöhte Anfälligkeit von Neugeborenen für Heinzkörperanämien zu erklären.

Zunächst ist zu bemerken, und das geht aus den Ergebnissen dieser Arbeit hervor, daß das unterschiedliche Verhalten von Neugeborenen- und Erwachsenenerythrozyten quantitativer Natur ist. Unter den Standardbedingungen dieser Experimente treffen auf einen Erythrozyten etwa 109 Moleküle APH. Erhöhte APH-Konzentrationen gleichen Geschwindigkeit und Typ der Reaktion von Erwachsenenerythrozyten an Neugeborenenerythrozyten an.

Für die Erklärung des Phänomens der erhöhten Heinzkörperempfindlichkeit von Neugeborenen finden sich in der Literatur zahlreiche Hinweise. Da Heinzkörper aus Oxydationsprodukten des Hämoglobins bestehen, wurde frühzeitig das Hauptaugenmerk auf die Funktion von Erythrozytenenzymen gelegt, die an der Regulation der oxydativen Vorgänge im Erythrozyten beteiligt sind, insbesondere auf die Katalase (10, 17, 19, 29) und die Glutathionperoxidase (9, 12, 26, 27, 29, 35).

In Übereinstimmung mit einem solchen Konzept sind zahlreiche Heinzkörperbildung auslösende Substanzen von der chemischen Struktur her solche, die in die Oxydationsprozesse der Zelle eingreifen, wie etwa Methylenblau, Natriumnitrit, o-Aminophenol, um nur einige zu nennen. Tatsächlich konnte jedoch bis jetzt nie eine eindeutige Beziehung zwischen diesen Enzymaktivitäten und der Empfindlichkeit von Erwachsenen- und Neugeborenenerythrozyten gegen Heinzkörperbildende Substanzen nachgewiesen werden. Eine ausführliche Diskussion dazu findet sich bei KLEIHAUER et al. (22).

Ein prinzipieller Einwand gegen diese Vorstellung ist auch, daß nicht notwendigerweise allen Heinzkörper-Bildungsreaktionen ein gemeinsamer Mechanismus

zugrunde liegen muß. Mit großer Wahrscheinlichkeit handelt es sich um Reaktionen, die zahlreiche Schritte beinhalten. Das heißt, eine Vielzahl von unterschiedlichen Primärschritten könnte zu einem gemeinsamen Endschritt führen. Weiterhin kommt nach anderen Befunden (30) eine erhöhte Empfindlichkeit des Hb F, das in den Neugeborenenerythrozyten zu etwa 90 % vorhanden ist, gegenüber dem Hb A in Erwachsenenerythrozyten nicht infrage.

Bei der Aufstellung von Alternativmodellen ist zu bemerken, und das zeigen auch die in der vorliegenden Arbeit gelieferten Ergebnisse, daß sowohl primäre als auch sekundäre Schritte der Heinzkörperproduktion an die Erythrozyten gebunden sind, und nicht in dem die Erythrozyten umgebenden Blutplasma liegen. Eine Möglichkeit zur Erklärung der unterschiedlichen Stimulierung der Heinzkörperbildung in Erwachsenen- und Neugeborenenerythrozyten durch APH könnte von einer unterschiedlichen funktionellen Struktur der Erythrozytenmembran ausgehen. Eine gewisse Wahrscheinlichkeit für ein solches Modell folgt bereits aus der chemischen Struktur einiger Heinzkörperbildenden Substanzen, von denen man aufgrund ihrer chemischen Struktur vermuten kann, daß sie nicht unmittelbar in das Oxydationsgeschehen der Zelle eingreifen, sondern eher eine Affinität zur Lipoproteinmembran der Erythrozyten zeigen. Als solche Substanzen sind zu nennen: Naphthalin, Nitrobenzol, Dinitrophenol, aromatische Amine, Menadionderivate, APH. Auf den Fall des APH angewendet, das in der vorliegenden Arbeit als Modellschubstanz diente, würden zwei verschiedene Partialmechanismen zu diskutieren sein. Da das APH als chemisch träge Schubstanz wahrscheinlich nicht selbst reagiert, würde man annehmen, daß die hydrolysierte Form reagiert. Entweder die Heinzkörperbildende Schubstanz, also das APH kann zwar frei durch die Membran permeieren, aber die Geschwindigkeit der Hydrolyse im Erythrozyten wäre unterschiedlich. Oder der Unterschied in der Enzymaktivität ist zwar unbedeutend, aber das APH weist eine unterschiedliche Permeabilität in die Erwachsenen- und Neugeborenenerythrozyten auf. Dieser Verdacht, daß nicht das APH sondern das Phenylhydrazin wirksam ist, wird dadurch bestätigt, daß das Phenylhydrazin in einer viel geringeren Konzentration von 0.34 mM einen weitaus größeren Effekt hat als das APH in einer weit höheren Konzentration von 10.9 mM. In den vorliegenden Ergebnissen wird gezeigt, daß Erythrozyten in der Lage sind, APH zu hydrolysieren und daß Phenylhydrazin in einer Konzentration entsteht, die zur Auslösung der beobachte-

ten Effekte durchaus ausreicht. Die Beobachtung auf der Grundlage der Austauschtransfusion würde eher für die zweite Hypothese sprechen, daß nämlich nach der Transfusion ein Unterschied in der Permeabilität auftritt. Man kann sich nur schwer vorstellen, daß die Enzymaktivität, die zur Hydrolyse von APH in Phenylhydrazin führt, nach Austausch in den Spendererythrozyten vergrößert wird. Wahrscheinlicher ist die Annahme, daß die Membran der Erwachsenenerythrozyten in dem veränderten Milieu verändert wird und somit ihre Permeabilität sich ändert. Freilich kann nicht ausgeschlossen werden, daß Enzymaktivitäten, etwa der Katalase oder Glutathion-Peroxidase, abnehmen. Dies sollte geprüft werden.

Die Beobachtung, daß durch Zusatz von Nabelschnurerythrozytenlysatz zu Erwachsenenerythrozyten die Heinzkörperbildungsgeschwindigkeit erhöht wird, kann so interpretiert werden, daß das außerhalb der Erwachsenenerythrozyten entstehende Phenylhydrazin in die Erwachsenenerythrozyten frei permeieren kann. Zwar wurden in dieser Arbeit größere Enzymaktivitäten, die zu einer Hydrolyse von APH in Phenylhydrazin führen, beobachtet, doch müssen diese Unterschiede in der Enzymaktivität nicht notwendigerweise die unterschiedlichen Heinzkörperbildungsgeschwindigkeiten erklären, da es unmöglich ist, die aktuelle Phenylhydrazin-Konzentration im Ansatz zu bestimmen.

Die Erklärung des Phänomens der Latenzzeit ist ein komplexes Problem. Man könnte sich vorstellen, daß langsam eindringendes APH, das in den Erythrozyten in Phenylhydrazin umgewandelt wird, dadurch die Membran schädigt, was wiederum zu einer größeren Permeabilität der Membran führen würde. Dies würde einen autokatalytischen Prozeß bedeuten. Eine solche Vorstellung könnte man etwa durch die Untersuchung der Heinzkörperbildung in Erythrozyten prüfen, deren Membran durch in vitro Einwirkung von Phospholipasen oder Antikörpern gegen Oberflächenantigene verändert wurden. Die ausgesprochene Verkürzung der Latenzzeit durch erhöhte Konzentration von APH im Ansatz bei Erhaltung der Heinzkörperbildungszeit, kann damit auf eine Beschleunigung des Prozesses der Membranzerstörung zurückgeführt werden. Damit in Übereinstimmung wäre die Beobachtung, daß die Heinzkörperbildung durch Phenylhydrazin weder bei Neugeborenen noch bei Erwachsenen eine Latenzzeit aufweist.

Die beobachtete Beschleunigung der Heinzkörperbildung bei Erhöhung des Sauerstoff Partialdruckes (22), mit dem die Erythrozytensuspension im Gleichgewicht steht, könnte auf einem ähnlichen Mechanismus beruhen: daß nämlich durch eine erhöhte Lipidperoxydation eine erhöhte Permeabilität des APH resultiert.

Diese Arbeit weist darauf hin, daß zur Erklärung der Heinzkörperbildung durch die verschiedensten Substanzen, eine Messung des zeitlichen Reaktionsablaufs nötig ist. Es müßte sich dann entscheiden lassen, welche Substanzen direkt die erwähnte Enzymaktivität in den Erythrozyten schädigen, und welche erst über eine Störung der Membranstruktur eine solche hervorrufen.

7. Zusammenfassung

1. APH führt in den Erythrozyten von Neugeborenenblut zu einer schnelleren Heinzkörperbildung als in den Erythrozyten von Erwachsenenblut. Die Kinetik dieser Reaktion ist charakterisiert durch eine initiale "Latenzphase". Auf diese folgt die Phase der Heinzkörperbildung, in der ein schneller Anstieg des Anteils Heinzkörperhaltiger Erythrozyten erfolgt. Der Unterschied in der Reaktion zwischen Neugeborenen- und Erwachsenenerythrozyten ist im wesentlichen bedingt durch die verkürzte "Latenzphase".
2. Die "Latenzzeit" wird in beiden Arten von Erythrozyten durch eine Erhöhung der APH-Konzentration verkürzt, und durch eine Erniedrigung verlängert.
3. Die Reaktion wird nicht beeinflusst durch dem Inkubationsmedium zugesetzte Substanzen wie Citrat und Glukose. Ersatz des Blutplasmas durch physiologische Kochsalzlösung führt zu keiner wesentlichen Änderung der Reaktion. Sie ist außerdem unabhängig von der Konzentration der Erythrozyten.
4. Zusatz von Nabelschnurerythrozytenlysat zu Erwachsenenerythrozyten führt zu einer erheblichen Verkürzung der Reaktion. Die Kombination von Erwachsenenerythrozyten in Erwachsenenerythrozytenlysat führt zu einer weit geringeren Wirkung.
5. Gelangen Erwachsenenerythrozyten durch Austauschtransfusion in den Neugeborenen-Organismus, so findet innerhalb kurzer Zeit eine Angleichung an die Reaktionsgeschwindigkeit von Neugeborenenerythrozyten statt. Dieser liegt im wesentlichen eine Verkürzung der Latenzzeit zugrunde.
6. Heinzkörperbildung kann auch durch Phenylhydrazin ausgelöst werden. Die Konzentrationen die notwendig sind, um vergleichbare Bildungsraten zu erzielen, liegen jedoch im Vergleich zum APH um einen Faktor von mehr als 30 niedriger. Diese Reaktion zeigt nicht das Phänomen der Latenzzeit. Außerdem ist die Geschwindigkeit, mit der Heinzkörper gebildet werden, von Nabelschnurblut geringer als von Erwachsenenblut.

7. Erythrozyten enthalten eine enzymatische Aktivität, die Phenylhydrazin aus APH freisetzen kann.
8. Es wird diskutiert, daß der erste Schritt im Mechanismus der Heinzkörperbildung durch APH in der Permeation durch die Erythrozytenmembran besteht, dem die Bildung von Phenylhydrazin innerhalb der Erythrozyten folgt. Das so entstandene Phenylhydrazin kann sowohl die Enzyme des Sauerstoff-Stoffwechsels in den Erythrozyten als auch die Erythrozytenmembran schädigen. Dies wiederum kann die Permeation von extraerythrozytärem APH beeinflussen. Es wird die Hypothese aufgestellt, daß für die unterschiedliche Sensibilität von Neugeborenen- und Erwachsenenerythrozyten gegenüber APH hinsichtlich der Heinzkörperbildung eine unterschiedliche Struktur und Permeabilität von beiden Erythrozyten-Typen zugrunde liegt.

Literaturverzeichnis

1. ALLEN, D.W. and JANDL, J.H.: Oxidative hemolysis and precipitation of hemoglobin. II. Role of thioles in oxidant drug action.
J. clin. Invest. 40, 454 (1961)
2. BEAVEN, G.H. and WHITE, J.C.: Oxidation of phenylhydrazines in the presence of oxyhaemoglobin and the origin of Heinz bodies in erythrocytes. Nature, London 173, 389 (1954)
3. BERGMAYER, H.U. und MOELLERING, H.: Enzymatische Bestimmung von Acetat.
Biochem. Ztschr. 344, 167 (1966).
4. BETKE, K.: Erworbene hämolytische Erkrankungen des Neugeborenen: in SCHUBOTHE Hämolyse und hämolytische Erkrankungen, p. 245 (Springer, Berlin/Göttingen/Heidelberg 1961).
5. BETKE, K.: Toxische hämolytische Anämie. In Opitz, H. und F. SCHMID (Eds.). Handbuch der Kinderheilkunde, VI. Bd., (Springer, Berlin/Heidelberg/New York 1967).
6. BEUTLER, E., DERN, R. and ALVING, A.: The hemolytic effect of primaquine. VI. An in vitro test for sensitivity of erythrocytes to primaquine.
J. Lab. clin. Med. 45, 40 (1955)
7. BEUTLER, E.: Drug-induced haemolytic anaemias and the mechanism and significance of Heinz body formation in red blood cells.
Nature, Lond. 196, 1095 (1962)
8. BORGES, A. and DESFORGES, J.F.: Studies of Heinz body formation.
Acta haemat. 37, 1 (1967).
9. BRACCI, R., CORVAGLIA, E., PRINCI, P., BETTINI, F. and PINDINELLI, C.: The role of GSH-peroxidase deficiency in the increased susceptibility to Heinz body formation in the erythrocytes of newborn infants.
Ital. j. Biochem. 18, 100 (1969)

10. BRENNER, S. and ALLISON, A.C. : Catalase inhibition: a possible mechanism for the production of Heinz bodies in erythrocytes.
Experientia 9, 381 (1953)
11. BROWN, A.K. and BUQUIR, S.L. : Spontaneous Heinz body formation in full-term and premature infants.
Amer. J. Dis. Child. 102 , 589 (1961).
12. COHEN, G. and HOCHSTEIN, P. : Glutathione peroxidase. The primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes.
Biochemistry 2, 1420 (1963).
13. DAWSON, J.P. THAYER, W.W. and DESFORGES, J.F. : Acute hemolytic anaemia in the newborn infant due to naphthalene poisoning.
Report of two cases, with investigations into the mechanism of the disease.
Blood 13, 1113 (1958).
14. GASSER, C. und KARRER, J. : Deletäre hämolytische Anämie mit "Spontan-Innenkörper"-Bildung bei Frühgeburt.
Helv. paediat. Acta 3, 387 (1948).
15. GASSER, C. : Die hämolytische Frühgeburtenanämie mit spontaner Innenkörperbildung: ein neues Syndrom, beobachtet an 14 Fällen.
Helv. paediat. Acta 8, 491 (1953).
16. GROSS, R.T. and SCHROEDER, E.A.R. : The relationship of triphosphopyridine nucleotide content to abnormalities in the erythrocytes of premature infants.
J. Pediat. 63, 823 (1963).
17. GROSS, R.T., BRACCI, R., RUDOLPH, N., SCHROEDER, E.A.R. and KOCHEN, J.A. : Hydrogen peroxide toxicity and detoxification in the erythrocytes of newborn infants.
J. Pediat. 63, 823 (1967).
18. IRLE, U. : Akut hämolytische Anämie durch Naphthalin-Inhalation bei zwei Frühgeborenen und einem Neugeborenen.
Dtsch. med. Wschr. 89 , 1798 (1964).

19. JACOB, H.S., BRAIN, M.C., DACIE, J.V., CARRELL, R.W. and LEHMANN, H. : Abnormal haem binding and globin SH group blockade in unstable haemoglobins.
Nature, Lond. 218, 1214 (1968)
20. JACOB, H.S., INGBAR, S.H. and JANDL, J.H. : Oxidative hemolysis and erythrocyte metabolism in hereditary acatalasia.
J. clin. Invest. 44, 1187 (1965).
21. JANDL, H.J., ENGLE, L.K. and ALLEN, D.W. : Oxidative hemolysis and precipitation of hemoglobin. I. Heinz body anemias as an acceleration of red cell aging.
J. clin. Invest. 39, 1818 (1960).
22. KLEIHAUER, E., BERNAU, A., BETKE, K., KELLER, M., KOHNE, E. und RIEGEL, K. : Heinzkörperbildung in Neugeborenen-erythrozyten. I. In-vitro -Studien über experimentelle Bedingungen und den Einfluß von Austauschtransfusionen.
Acta haemat. 43, 333, (1970).
23. KÜNZER, W., SCHÜTZ, E. und BENSCH, J. : Untersuchung zur Heinzkörperbildung in Neugeborenenerythrozyten. VI. Mitteilung. Zur Morphologie der durch Analoga mit Vitamin-K-Wirkung und Vitamin C erzeugten Heinzkörper.
Z. Kinderheilk. 83, 471 (1960).
24. KÜNZER, W., AMBS, E. und SCHNEIDER, D. : Untersuchungen zur Heinzkörperbildung in Neugeborenenerythrozyten.
Z. Kinderheilk. 74, 652 (1954).
25. KUSUMOTO, S. and NAKAJIMA, T. : The constitution of Heinz bodies.
Arch. exp. Path. Pharmacol. 259, 266 (1968).
26. NECHELES, T.F., BOLES, T. and ALLEN, D.M. : Erythrocyte glutathione peroxydase deficiency and hemolytic disease of the newborn infant.
J. Pediat. 72, 319 (1968).

27. NECHELES, T.F., MALDONADO, N., BARQUET-CHEDIAK, A. and ALLEN, D.M.: Hemozygous erythrocytes glutathione peroxydase deficiency. Clinical and biochemical studies. *Blood* 33, 164 (1969).
28. STRÖDER, J., KÜNZER, W., und MÜLKE, G.
Dtsch. med. Wschr. 1553 (1959).
29. TJOA, G.T.: Untersuchungen über Heinzkörperbildung und Glutathionstabilität in Erythrozyten von Neugeborenen.
Z. Kinderheilk. 84, 484 (1960).
30. ULUKUTLU, L., KLEIHAUER, E., and BETKE, K.: The behaviour of foetal haemoglobin in the enhanced Heinz body formation in red cells of newborn infants.
Acta paediat. scand. 55, 473 (1966).
31. VALAES, T., DOXIADIS, S.A. and FESSAS, P.: Acute hemolysis due to naphthalene inhalation.
J. Pediat. 63, 904 (1963).
32. WALLER, H.D. und LÖHR, G.W.: Neue Ergebnisse zum Mechanismus der Heinzkörperbildung in Erythrocyten.
Folia haemat. N.F. 8, 1 (1963).
33. WILLI, H.: Innenkörperbildung durch Elkosin und spontane Innenkörperbildung.
Schweiz. med. Wschr. 77, 243 (1947).
34. WILLI, H. und HARTMEIER, F.: Spontane Innenkörperbildung beim Neugeborenen.
Schweiz med. Wschr. 80, 1091 (1950).
35. ZINKHAM, W.H.: An in vitro abnormality of glutathione metabolism in erythrocytes from normal newborns. Mechanism and clinical significance.
Pediatrics 23, 18 (1969).

Ich danke Herrn Prof. Dr. E. Kleihauer für stete Unterstützung und zahlreiche Anregungen.

Herrn Prof. Dr. K. Betke danke ich für die Möglichkeit, die Arbeit in seiner Klinik ausführen zu können.

Herrn Prof. Dr. Hickl (I. Frauenklinik der Universität München) danke ich für die großzügige Überlassung von Nabelschnurblut.

LEBENS LAUF

Am 14.3.1943 wurde ich als Tochter des Dipl.-Ing. Erich Keller und seiner Ehefrau Rosemarie, geb. Emmerling, in München geboren. 1946 siedelten wir nach Laggenbeck in Westfalen über. Dort besuchte ich von Ostern 1950 bis 1954 die kath. Volksschule. Von Ostern 1954 bis Ostern 1959 besuchte ich die private Mädchen-Realschule in Ibbenbüren in Westfalen. Dann wechselte ich über zum neusprachlichen Gymnasium für Mädchen in Osnabrück-Haste. Dort legte ich am 11. März 1964 die Reifeprüfung ab. Im Sommersemester 1964 begann ich mein Medizinstudium an der Ludwig-Maximilian-Universität in München. Im Herbst 1967 bestand ich das Physikum und schloß am 18. Februar 1971 mit dem medizinischen Staatsexamen ab. In der Zeit von Januar 1968 bis Januar 1970 fertigte ich in der Universitäts-Kinderklinik in München die vorliegende Arbeit an.

